



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

## **Microorganismos de la plastisfera y la biodegradación del plástico por la microbiota digestiva de diferentes insectos**

**Microorganisms of the plastisphere and the biodegradation of plastic by the digestive microbiome of different insects**

Trabajo de fin de grado

Nº 304

Facultad de Biología. Grado en Biología

Héctor Arribas Arias

#### Abstract:

The problem of the plastic waste issue is more concerning every year, this project aims to investigate the emergence of a new ecosystem “The plastisphere”, the main factors in plastic biodegradation, the discovery of different microorganisms capable of using these materials as a carbon source and the finding of polymer biodegradation capabilities in multiple organisms thanks to the composition of their gut microbiota. Furthermore, an experiment is proposed about the modification of the gut microbiome in non-plastic eating organisms for the acquisition of this trait, and in doing so, stopping, or at least, reducing plastic transfer through the trophic chain, which ends up in humans causing unknown consequences.

#### Resumen:

El problema de la basura plástica es cada vez más preocupante por lo que este trabajo pretende indagar en la aparición de un nuevo ecosistema “La plastisfera”, los factores principales que afectan a la biodegradación de los plásticos, el descubrimiento de diferentes microorganismos capaces de utilizar estos compuestos como fuentes de carbono y el hallazgo de varios organismos multicelulares con las mismas competencias gracias a la composición de su microbiota intestinal. Además, propone un experimento para la modificación de la microbiota de organismos no consumidores de plásticos para la adquisición de esta capacidad, e intentar evitar el paso de los polímeros por la cadena trófica hasta el ser humano, lo cual tiene consecuencias desconocidas.

## Índice:

1.	Introducción.....	1
2.	Objetivos.....	1
3.	Metodología .....	1
4.	Composición de la plastisfera.....	2
5.	Factores que afectan la degradación del plástico.....	3
6.	Microorganismos capaces de degradar plásticos.....	7
7.	Organismos capaces de degradar plásticos.....	9
8.	Propuesta de investigación: Modificación de la microbiota.....	11
9.	Conclusiones.....	16
10.	Bibliografía.....	17

## 1- INTRODUCCIÓN

La producción de plásticos ha llegado a 350 millones de toneladas de plásticos en 2017 y 368 millones en 2019. (Amaral-Zettler et al., 2020, "Publicaciones :: PlasticsEurope", 2021). El aumento de estos compuestos en el medio ambiente ha provocado una rápida adaptación de diferentes microorganismos a consumir y vivir en este sustrato formando así un nuevo ecosistema denominado "Plastisfera". Principalmente son bacterias que han empezado a consumir polímeros sintéticos como fuentes de carbono utilizando diferentes enzimas, algunas ya existentes y otras mínimamente modificadas para separarlos en monómeros y permitir así la obtención de energía a partir de ellos. El uso de estas enzimas es principalmente gracias a la presencia de los enlaces de algunos compuestos naturales dentro de diversos polímeros. Estas bacterias se han encontrado libres en el medio, asociadas a biofilms, y recientemente en la microbiota de varios organismos eucariotas confiriéndoles la capacidad de degradar diferentes polímeros. Conocer estos microorganismos y entender cómo se están produciendo estos cambios es de vital importancia para encontrar una solución.

## 2- OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG es realizar una revisión de la degradación del plástico a través de los microorganismos que habitan en la plastisfera, con especial interés en la biodegradación por la microbiota de insectos. Este objetivo principal se desglosa en los siguientes puntos:

- Comprender el funcionamiento de este nuevo ecosistema, los factores bióticos y abióticos que afectan a la degradación del sustrato que lo conforma.
- Analizar las bacterias que son capaces de participar en el proceso de degradación y cómo lo hacen.
- Entender la importancia de las bacterias simbiotes de la microbiota de diferentes insectos en el proceso de degradación de los plásticos.
- Proponer un proyecto de investigación que permita explorar la posibilidad de realizar transferencias de microbiota entre múltiples organismos para adquirir la capacidad de degradación de ciertos polímeros plásticos, además de comparar las diferencias entre los microbiomas de los individuos.

## 3- METODOLOGÍA

La metodología de este trabajo ha consistido en una revisión bibliográfica sobre la biodegradación del plástico, la formación de la plastisfera, su distribución y composición, los microorganismos libres

capaces de degradar polímeros sintéticos y los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal de diversos invertebrados con la misma capacidad. Para esto, se han realizado varias fases: Primero, han sido consultadas múltiples fuentes bibliográficas. Se han consultado artículos de revistas científicas, libros y proyectos de investigación principalmente a través de buscadores bibliográficos (Google Scholar) y bases de datos (NCBI, PubMed). Las principales palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron: “Plastisfera”, “Biodegradación”, “Microorganismos”, “*Tenebrio molitor*”, “Microbiota”. La mayoría de fuentes recabadas estaban escritas en inglés, con algunas excepciones en español. La introducción de las fuentes en el trabajo se basó en la selección de estudios que abordasen el tema estudiado, que realizasen preguntas similares a las que pretende responder este trabajo. Además, solo se pudieron seleccionar aquellos artículos de libre acceso, aquellos a los cuales tenía acceso la USAL o aquellos que me pudo proporcionar mi tutor. Posteriormente se examinaron a fondo las fuentes y se seleccionaron aquellas que mejor se adaptaban a los objetivos de este trabajo, descartando el resto. En cuanto a la limitación temporal, se han buscado las fuentes más recientes posibles con los datos más actuales. En la última fase se han analizado las fuentes y se han tomado conclusiones propias incluyendo toda la información obtenida culminando en la idealización del proyecto final. Para la citación se han seguido la séptima edición de las normas APA.

#### 4- COMPOSICIÓN DE LA PLASTISFERA.

El término “Plastisfera” se refería originalmente a la vida en microplásticos (basura plástica <5 mm) recolectada en el giro subtropical del Atlántico Norte, pero desde entonces se ha utilizado para describir la vida asociada con los desechos plásticos en muchos ambientes.

Los desechos plásticos proporcionan una base para los microorganismos que dura mucho más que la mayoría de sustratos flotantes naturales y funcionan como un vector para el transporte de especies de algas nocivas y contaminantes orgánicos persistentes (COP) (Zettler et al., 2013). Los plásticos más utilizados en 2018 y que forman la mayoría de desechos en este ecosistema son, PP (Polipropileno), PE-LD/PE-LLD (Polietileno de baja densidad), PE-HD/PE-MD (Polietileno de alta y media densidad), PVC (Policloruro de vinilo), PUR (Poliuretano), PET (Tereftalato de polietileno) y PS (Poliestireno, que incluye EPS (Poliestireno expandido) y XPS (Poliestireno extruido)) (“Publicaciones :: PlasticsEurope”, 2021).

Dentro de la plastisfera podemos definir 4 tipos de restos plásticos según su tamaño, “microlitter” que incluye detritus muy fino de entre 63 y 500 micrómetros, “mesolitter” que incluyen desechos plásticos de un tamaño entre 5 y 10 mm, “macrolitter”, grupo que contiene materiales de hasta 15 cm de diámetro, visibles a simple vista, y “megalitter” que abarca materiales que se miden en decímetros o tamaños mayores (Andrady, 2003).

Estos restos presentan una superficie hidrofóbica que estimula la rápida creación de biofilms por los microorganismos presentes en la columna de agua. Los análisis de secuenciación de ADN muestran que estas comunidades son consistentemente distintas entre los plásticos y el entorno acuoso (Zettler et al., 2013). Se observa que estas comunidades se ven afectadas por el clima, la composición química del agua, el tipo de plástico usado como sustrato y la localización geográfica (Kirstein et al., 2019), sin embargo, a pesar de dichos factores, de manera general, podemos indicar múltiples especies comunes procariotas que conforman los biofilms encontrados en la plastisfera. Estos incluyen miembros de las familias Flavobacteriaceae, Erythrobacteraceae, Hyphomonadaceae y Rhodobacteraceae (Zettler et al., 2013). Durante la formación de estos biofilms se ha observado un cambio gradual en la abundancia de diferentes clases de bacterias. A lo largo del tiempo se puede reconocer un aumento en abundancia relativa de alpha y betaproteobacteria y flavobacteria, a la vez que se produce una reducción en la abundancia relativa de gammaproteobacteria (De Tender et al., 2017). De Tender et al. (2017) concluyen que las gammaproteobacterias son colonizadores primarios que permitirían la colonización del material por especies que aparecen posteriormente.

A pesar de la gran diversidad observada, muchas especies detectadas en las superficies de los plásticos son organismos oportunistas que podrían crecer en casi cualquier sustrato, por ejemplo, diferentes especies del género *Vibrio* cuya baja y esporádica presencia nos indica que son meros pasajeros sin influencia directa o indirecta sobre la degradación (Debroas et al., 2017).

## 5 - FACTORES QUE AFECTAN LA DEGRADACIÓN DEL PLÁSTICO

La biodegradación de polímeros tanto sintéticos como biológicos, es el proceso por el cual a través de la secreción de enzimas que pueden romper diferentes enlaces moleculares dentro del polímero, este es cortado a unidades de menor tamaño por parte de diferentes microorganismos. La mayoría de los polímeros son demasiado grandes como para pasar a través de las membranas celulares por lo que primero han de ser despolimerizados a monómeros. Una vez reducidos pueden ser absorbidos y utilizados como fuente de carbono y energía (Shah et al., 2008).

Según su resistencia a la hidrólisis y por ende su resistencia a la biodegradación, podemos dividir los polímeros en dos tipos, hidrolizables y no hidrolizables.

- **Polímeros hidrolizables:** Presentan enlaces diferentes a C-C y C-H, como son los grupos carbonilo C=O; que pueden ser fácilmente hidrolizados por enzimas tipo lipasas, cutinasas e hidrolasas. Son plásticos como PET, PUR y policarbonatos (Zettler et al., 2020; Peng et al., 2020).
- **Polímeros no hidrolizables:** Presentan un esqueleto conformado totalmente por enlaces C-C, mucho más resistentes a la degradación tanto química como biológica. Algunos estudios indican que las enzimas oxidasas y oxigenasas podrían romper este enlace facilitando la biodegradación. Se

les conoce también como plásticos recalcitrantes debido a su alta permanencia en el medio, son los PE, EPS y PP. (Zettler et al., 2020; Xu et al., 2019).

La biodegradación de todos los compuestos plásticos provoca un aumento en el número de grupos ésteres ( $C=O$ ,  $CO$ ), carboxilos ( $C=O$ ,  $C-O$ ,  $O-H$ ), hidroxilos ( $C-O$ ,  $O-H$ ) y vinilos terminales ( $=CH_2$ ) (Vague et al., 2019). Por lo que, para determinar cambios en el material estudiado puede analizarse el aumento del número de estos enlaces.

Este proceso va a depender de diferentes factores como las características del polímero, el tipo de organismo y el pretratamiento, si lo hay. Además, puede facilitarse por diferentes pasos bióticos y abióticos, solubilización, oxidación, hidrólisis y escisión enzimática.

Las largas cadenas hidrocarbonadas, altamente hidrofóbicas de polímeros como el PE, lo hacen extremadamente resistente a la biodegradación, por ello, se ha estudiado la posibilidad de utilizar compuestos tensioactivos, surfactantes y **biosurfactantes** para agilizar el proceso.

Los surfactantes son un conjunto de moléculas anfipáticas con la capacidad de reducir la tensión superficial y la tensión interfacial de dos compuestos. En este caso, se utilizan porque pueden solubilizar hidrocarburos cuando se aplican por encima de su concentración de micelar crítica (CMC) (Mukherjee et al., 2017). La CMC es la concentración mínima a la cual un surfactante es capaz de formar micelas (Iustman et al., 2009). Los hidrocarburos hidrofóbicos se van a introducir al interior de las micelas, aumentando su tamaño a varios armstrong de diámetro. Las micelas están recubiertas de una capa de surfactante y van a formar microemulsiones solubilizando los hidrocarburos en su interior (Salager, 1993).

Los **biosurfactantes** son compuestos tensioactivos producidos por microorganismos que pueden aumentar la biodisponibilidad acrecentando la solubilidad de los hidrocarburos, mejorando así la degradación, además no son tóxicos y son ampliamente utilizados en vertidos de petróleo.

La **oxidación** es un proceso a través del cual se forman enlaces carbonilo en el esqueleto de C-H del polímero, permitiendo el consumo posterior del compuesto oxidado (Mukherjee et al., 2017).

Hay dos tipos de oxidación según qué agente la produzca, fotooxidación y oxidación térmica.

La **fotooxidación** puede ser producida de manera natural por la luz solar, una de las causas que forman los micro y nanoplásticos, pero también se puede utilizar luz ultravioleta artificial para introducir enlaces tipo éster en la molécula. La sensibilidad a la fotodegradación (Fotooxidación mediada por fotólisis) va a depender de la capacidad de los polímeros para absorber la parte dañina de la radiación solar (Shah et al., 2008), esto incluye radiación UV-B (295- 315 nm) y radiación UV-A (315- 400 nm), las cuales van a producir fotodegradación directa. La luz del espectro visible (400-760 nm) acelera el proceso de degradación aumentando la temperatura y la luz infrarroja (760-2500 nm) agiliza la oxidación térmica (Shah et al., 2008).

La **oxidación térmica** se produce espontánea y artificialmente por exposición del compuesto a altas temperaturas modificando su estructura y propiedades. En estudios realizados por Mukherjee et al. (2017) & Suresh et al. (2011), se observó un aumento de grupos carbonilos al someter PE a 45°C y a 65°C, siendo la adición de grupos carbonilos mayor al incrementar la temperatura. En cuanto a las propiedades, la proliferación de grupos polares modifica la hidrofobicidad de la superficie, y lo vuelve hidrofílico. Asimismo, se percibió la formación de grietas de nanómetros de anchura, las cuales facilitarían la colonización microbiana del material y su destrucción.

Es importante hacer alusión a la oxo-biodegradación, que utiliza fotodegradación y oxidación térmica como pretratamiento artificial. Estos dos procesos reducen el peso molecular del compuesto y permiten su biodegradación (Shah et al., 2008). La cepa 707 de la bacteria *Brevibacillus borstelensis* puede utilizar PE como única fuente de carbono y energía. De esta misma, se observó una biodegradación mucho mayor al pretratar el PE con radiación UV, fotooxidándolo (Hadam et al., 2005).

La **hidrólisis espontánea** es la reacción más importante para iniciar la degradación ambiental de polímeros sintéticos. La hidrólisis de los enlaces éster de la cadena principal del polímero conduce a la degradación, sin embargo, la hidrólisis espontánea de los enlaces éster de la cadena lateral puede conducir a la solubilización (Vague et al., 2019).

En cuanto a la **escisión enzimática**, se produce en dos fases, secreción y adhesión de las enzimas segregadas por los microorganismos, y posterior catálisis de los enlaces del polímero, principalmente enlaces de tipo éster. Para que se pueda producir este proceso los compuestos han de tener enlaces de tipo éster en su estructura o han de adquirirlos a través de oxidación. Se han observado bacterias y hongos capaces de producir enzimas que degraden materiales plásticos, los cuales presentan un potencial de degradación variable. Algunos géneros de microorganismos estudiados con esta capacidad son *Thermobifida*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Ideonella*.

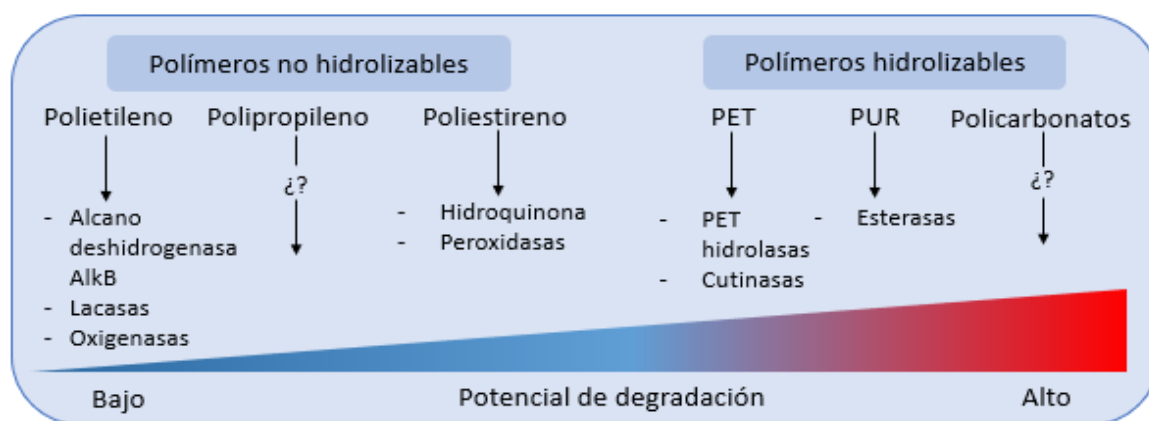


Figura 1: Potencial de biodegradación de los principales polímeros por diferentes tipos de enzimas y aditivos. Basado en (Hu et al., 2021).



Se han encontrado varios tipos de enzimas capaces de degradar diferentes polímeros (Figura 1), con distinto potencial de degradación según sean o no hidrolizables. El sistema de degradación enzimática mejor estudiado es aquel que afecta al PET, generalmente el grado en el que la degradación ocurre es bastante bajo (Pérez-García et al., 2021). Se listan a continuación diferentes enzimas:

Las **cutinasas** son serín-esterasas de la superfamilia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. El sitio activo de las mismas puede albergar compuestos de alto peso molecular como la cutina y compuestos sintéticos relacionados rompiendo el enlace éster formando monómeros (Egmond & de Vlieg, 2000). La hidrólisis de polímeros sintéticos como PET ha sido estudiada y reportada por diversos autores. Dimarogona et al. (2015), informaron sobre la estructura cristalina y la expresión de una cutinasa en *Fusarium oxysporum*, indicando su posible aplicación en la modificación y degradación de PET.

Se conocen cutinasas de múltiples hongos, *Humicola insolens*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y bacterias *Pseudomonas mendocina*, *Thermobifida cellulolytica*, entre otras (Maurya et al., 2020).

Las **lipasas** causan la degradación efectiva de nanopartículas de PET gracias a que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en el plástico. La lipasa de *Candida cylindracea* y *Pseudomonas sp.* ha sido descrita por Ma et al. (2012). Del mismo modo, Wang et al. (2008) emplean lipasa inducida por bis(hidroxietil)tereftalato (BHET)/ácido tereftálico (TPA) de *Aspergillus oryzae* para la hidrólisis de PET. Tanto lipasas como cutinasas presentan hidrofobicidad superficial, y al contrario que otras lipasas, la lipasa B presenta un sitio catalítico superficial, de manera que en ausencia de una interfaz hidrofóbica aún es accesible al sustrato (Maurya et al., 2020).

Las **esterasas** pueden degradar los enlaces tipos éster que unen los monómeros que conforman el PET, estos pueden ser degradados por diferentes esterasas. Una poliesterasa recombinante termoestabilizada de *Saccharomonospora viridis* AHK190 capaz de hidrolizar PET fue utilizada por Kawai et al. (2014), y se observó que la actividad de hidrolización de PET aumentaba en presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maurya et al., 2020).

Las **PETasas** son  $\alpha/\beta$  hidrolasas que degradan ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), y en concreto degradan PET. La PETasa (3.1.1.101) y las cutinasas comparten una alta identidad de secuencia, lo cual indica la existencia de características estructurales críticas responsables de la unión del sustrato (Fecker T. et al., 2018; Kawai F. et al., 2019). En 2016 se observó in vivo el mecanismo de hidrólisis de PET por primera vez. El proceso lo realizó *Ideonella sakaiensis*, a través de dos enzimas, PETasa (3.1.1.101) y MHETasa (Pérez-García et al., 2021). La PETasa va a hidrolizar PET en bis(hidroxietil)tereftalato (BHET), mono(hidroxietil) tereftalato (MHET), ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) y la MHETasa va a degradar MHET en TPA y EG que van a poder ser incorporados en el metabolismo. A pesar de su capacidad de producción de estas enzimas, *Ideonella sakaiensis*

sólo puede degradar plástico amorfo. El PET que conforma las botellas de agua típicas es altamente cristalino y por tanto, no puede ser degradado en la naturaleza por estas bacterias. Una hipótesis es que la PETasa puede degradar PET cristalino pero a un ritmo tan lento que no permite el crecimiento bacteriano (Wallace et al., 2020).

## 6- MICROORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR PLÁSTICOS

El conocimiento sobre la biodiversidad de microorganismos capaces de degradar parcial o totalmente diferentes tipos de polímeros ha aumentado considerablemente gracias a la gran cantidad de investigaciones publicadas en los últimos años. Se clasifican los microorganismos según el tipo o tipos de plásticos que pueden degradar.

### **Tereftalato de polietileno (PET)**

Se conocen pocas bacterias y hongos que degraden PET, la mayoría de las bacterias aisladas con esta característica son miembros del filo Gram (+) Actinobacteria (Danso et al., 2019) y *Bacillus* (Hu et al., 2010). En el estudio realizado por Hu et al, un 70% de las cepas aisladas fueron de los géneros *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Saccharomonospora*, y *Thermoactinomyces* dentro de Actinomycetes, y aproximadamente un 30% fueron de los géneros *Bacillus*, *Ureibacillus* y *Aneurinibacteria*. De todas estas, *Thermobifida alba* cepa AHK119 exhibió una mayor competencia en la degradación de PET. Una característica esencial es la colonización del material que se desea degradar, es decir, han de ser capaces de formar biofilms. En el estudio realizado por Vague et al. (2019), se observa que *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas chlororaphis* tienen la capacidad de hacer biofilms sobre el plástico PET, asimismo, se infiere que el consorcio entre *Pseudomonas chlororaphis* y *Bacillus cereus* puede degradar plástico de una manera más rápida que cualquier cepa por separado debido a una mayor actividad lipasa. Posteriormente se ha conseguido aislar un consorcio de una gran variedad de bacterias que fue denominado “Consortio 46”, este, tiene la potencial utilidad de degradar PET completamente, produciendo CO<sub>2</sub> como subproducto que podría ser utilizado para la fertilización en invernaderos. El consorcio está conformado por bacterias, levaduras y protozoos que actúan de manera sinérgica. De las especies investigadas, *Bacillus megaterium* va a formar biofilms en el sustrato, *Rhizopus sp.* crece en el biofilm y rompe el enlace éster del PET formando BHET que es posteriormente degradado por *Pseudomonas sp.* en monómeros de TPA y EG, finalmente estos serán asimilados y metabolizados por *Micobacterium sp.* y *Pigmentiphaga sp.* (Taniguchi et al., 2019). Es importante volver a mencionar a *Ideonella sakaiensis*, y hacer hincapié en la cepa 201-F6T, obtenida del consorcio bacteriano 46. Esta va a degradar PET y produce CO<sub>2</sub> como producto de la oxidación completa de dicho polímero. Las células de *I. sakaiensis* pueden adherirse y crecer sobre el PET

uniéndose entre ellas a través de apéndices, los cuales se cree que podrían ayudar a la secreción de enzimas (Taniguchi et al., 2019 & Tanasupawat et al., 2016).

### **Poliestireno (PS)**

Algunas bacterias han sido reportadas como miembros de diferentes consorcios que forman biofilms sobre partículas de poliestireno, observándose una cierta biodegradación en varios casos (Danso et al., 2019). Fueron aisladas a partir de *screening* en humedales las cepas DR11 de *Exiguobacterium sibiricum* y DR14 de *Exiguobacterium undae*, las cuales, mostraron un potencial de biodegradación prometedor frente a este sustrato. Tras la incubación con estas bacterias, se observó una capacidad para formar biofilms sobre la superficie del PS, con una posterior reducción del peso y un aumento de la rugosidad en el film de PS, reduciendo así la hidrofobicidad del polímero y favoreciendo una posible posterior degradación (Chauhan et al., 2018). A pesar de estos estudios, no se ha demostrado que ninguna enzima de un microorganismo de vida libre sea capaz de romper su estructura. Podemos, sin embargo, indicar algunas bacterias con ciertas enzimas que por su función y características podrían degradar este compuesto. Los principales filos en los que se distribuyen estas potenciales enzimas son Proteobacteria y Actinobacteria, siendo Bacterioidota y Firmicutes también posibles candidatos (Hou & Majumder, 2021). Oxidorreductasas como el citocromo P450, monooxigenasas, alcano-hidroxilasas e hidroxilasas de anillo aromático manifiestan una mayor posibilidad de degradar PS que las alpha/beta hidrolasas en los primeros estadios de la degradación ya que este polímero no presenta enlaces de tipo éster (Hou & Majumder, 2021). El citocromo P450 CPY152A1 aislado de *Bacillus subtilis* y el citocromo P450 CPY152B1 procedente de *Sphingomonas paucimobilis*, en presencia de peróxido de hidrógeno pueden catalizar la hidroxilación del etilbenceno y la epoxidación de estireno (Shoji et al., 2007; Fujishiro et al., 2012). Así mismo, la enzima citocromo P450 CYP116B5 de *Acinetobacter radioresistens* S13 puede oxidar cadenas de alcanos desde 14 a 36 carbonos (Minerdi et al., 2014). Esta primera oxidación puede regirse por los citocromos P450 que va a degradar los alcanos para convertirlos en alcoholes primarios, que luego se oxidan al aldehído correspondiente y finalmente se convierten en un ácido graso (Rojo, 2010). La cadena de PS va a tener una mayor probabilidad de escindirse que los anillos aromáticos debido a los enlaces C=C que presentan, sin embargo, una hidroxilasa de anillo aromático podría teóricamente escindir el anillo incorporando dos átomos de di-oxígeno en el mismo. Las dioxigenasas de hidroxilación de anillo de *Rhodococcus* sp. P14 y *Sphingobium* sp. FB3 son capaces de oxidar el antraceno y el benzoantraceno, pudiendo posiblemente contribuir a la descomposición de PS (Peng et al., 2018; Fu et al., 2018).

### **Polietileno (PE)**

La biodegradación de PE ha sido asociada a múltiples géneros de bacterias, entre ellos se encuentran, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas* dentro de las Gram (-) y, *Rhodococcus*,

*Staphylococcus*, *Streptomyces* y *Bacillus* dentro de las Gram (+). A pesar de estos hallazgos, la biodegradación completa de PE no ha sido probada (Montazer et al., 2020).

Algunos microorganismos pueden comenzar este proceso mediante la oxidación. Este proceso se conoce como “biodeterioro” y puede ocurrir anterior o ulteriormente a una degradación abiótica. Durante este proceso la estructura básica del PE va a ser modificada, provocando la formación de oligómeros oxidados y la transformación de este polímero. A consecuencia de esto, las propiedades físicas y químicas del polímero van a modificarse, abriendo nuevos caminos para que diferentes enzimas los degraden (Montazer et al., 2020). El comienzo de la oxidación se produce con la hidroxilación de los enlaces C-C para formar alcoholes primarios y secundarios, que posteriormente serán degradados a ácidos carboxílicos. Estos son análogos a los ácidos grasos y pueden ser catabolizados en la betaoxidación.

Muchos de los microorganismos que despolimerizan PE son capaces de degradar n-alcanos lineales como la parafina. Teniendo los n-alcanos una estructura básica idéntica a la de PE y un proceso biodegradativo mucho más conocido, se han utilizado como modelo para estudiar las enzimas que actúan en el proceso y los genes que las codifican (Gyung Yoon et al., 2012). Una de las enzimas más conocidas son las alcano-hidroxilasas. El genoma de *Pseudomonas aeruginosa* codifica dos de ellas alkB1 y alkB2 y el de *Rhodococcus sp.* TMP2 codifica 5, alkB1, alkB2, alkB3, alkB4 y alkB5 (Takei et al., 2008). Gyung Yoon et al. (2012), demostraron que la enzima alkB producida por *Pseudomonas aeruginosa* cepa E7 participaba activamente en la degradación de PE de baja masa molecular y era una pieza central en la mineralización del mismo a CO<sub>2</sub>. Las enzimas fenol-oxidasas expresadas por *Rhodococcus ruber* también juegan un papel importante en la biodegradación (Santo et al., 2013).

El uso de bacterias capaces de formar biofilms en el PE y segregar surfactantes también se ha tenido en cuenta. Los géneros de bacterias que más exhiben esta capacidad son *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Bacillus*. Estas especies son las de mayor biodegradación observada, no obstante, la formación de biofilms no necesariamente indica degradación (Alvarez, 2003). La producción de biosurfactantes parece tener una fuerte correlación con la colonización y degradación del PE, por ejemplo, la surfactina producida por *Bacillus subtilis* (Vimala & Mathew, 2016).

## 7- ORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR PLÁSTICOS

Todos los microorganismos mencionados anteriormente se encuentran en el medio ambiente de forma libre o bien asociados a biofilms, sin embargo, los polímeros plásticos no solo pueden transferir contaminantes tóxicos por el agua, sino también lixiviación de plastificantes a la base de la cadena alimentaria, potencialmente conduciendo a bioacumulación. Varios estudios han detectado la presencia de microplásticos en humanos, compuestos de organoestaño entre otros, utilizados para la

estabilización del PVC (Cloruro de polivinilo) (Takahashi et al., 1999). Las consecuencias en la salud de dichos compuestos tanto en humanos como en otros seres vivos no son del todo conocidas.

Se han encontrado algunos organismos con una microbiota bacteriana capaz de degradar varios tipos de plásticos, la gran mayoría son insectos, principalmente coleópteros de la familia Tenebrionidae y lepidópteros. Algunos de ellos, presentan una dieta que los hace ideales para la posible degradación de polímeros sintéticos.

A partir del lumen del intestino medio de las larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* de la familia Tenebrionidae, familia cosmopolita encontrada en todos los continentes menos Antártica, se ha conseguido aislar una cepa bacteriana degradadora de poliestireno (PS) *Exiguobacterium sp.* cepa YT2. Esta mostró una capacidad degradativa mucho menor fuera del microambiente formado en el intestino del coleóptero, indicando un posible efecto sinérgico con el aparato digestivo de *T. molitor* (Shan et al., 2020).

La presencia de grupos carbonilo en las muestras tras la inoculación de los microorganismos en las mismas, es una indicación de la degradación del PS y PE (Yang et al., 2014). Posteriormente se corroboró que la capacidad degradativa de las larvas de *T. molitor* era exclusivamente bacterio-dependiente pues al suministrar a las mismas con el antibiótico gentamicina y consecuentemente suprimiendo su microbiota intestinal, la despolimerización de PS se detuvo (Yang et al., 2015). En estudios posteriores se ha descubierto la capacidad de degradación de PVC, observándose un ratio de consumo de  $36,62 \pm 6,79$  mg por cada 100 larvas en un periodo de 16 días. En los excrementos se encontró un 34,6% de PVC residual y carbonos orgánicos clorados. Además, se trató a las larvas con gentamicina, lo que redujo drásticamente la capacidad de estas larvas para degradar el PVC indicando una bacterio-dependencia en la biodegradación de este plástico (Peng et al., 2020). En el mismo año ha sido aislado un consorcio bacteriano a partir del intestino de *T. molitor* alimentado con PE, formado por las bacterias *Acinetobacter sp.* cepa NyZ450 y *Bacillus sp.* cepa NyZ451. Es remarcable el hecho de que las bacterias por separado no mostraban esta característica pero sí cuando se encontraban en el consorcio. Las bacterias formaron un biofilm en la superficie del PE y tras 30 días a 23° C se produjo una reducción del peso del sustrato del 18% (Yin et al., 2020).

De la misma familia se ha descubierto que las larvas de *Tenebrio obscurus*, también pueden consumir PS. Se observó una capacidad de despolimerización mayor que en *T. molitor* y al igual que en esta, la degradación es bacterio-dependiente. En una prueba comparativa en la que se alimentó a las larvas durante 31 días con PS como única dieta, la masa consumida de PS por parte de *T. obscurus* fue de  $55,4\% \pm 1,5\%$  mientras que la de *T. molitor* fue  $41,5\% \pm 3,0\%$  (Peng et al., 2019).

En el sistema digestivo de las larvas de *Zophobas atratus*, un género diferente pero dentro también de la familia Tenebrionidae, conocidas comúnmente como “superworms”, se ha encontrado y aislado

de manera exitosa una cepa de *Pseudomonas sp.* que puede degradar el PS (Kim et al., 2020). Previamente se habían encontrado cepas de *Pseudomonas* con la competencia para degradar otros tipos de plásticos en la naturaleza, sin embargo, el estudio realizado por Kim et al. (2020), es el primero en encontrar una cepa de *Pseudomonas sp.* formando parte de la microbiota de otro organismo con la capacidad de degradar PS, la cepa es *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071. Durante el estudio se comparó el consumo de PS de las larvas de *T. molitor* y las larvas de *Z. atratus*. Tras 21 días la diferencia en la capacidad de consumición era evidente, del total de 2 g ofrecidos a 50 larvas de cada especie, 1,42 g fueron agotados por las larvas de *Z. atratus* y 0,22 g fueron agotados por las de *T. molitor*. Esto puede achacarse al mayor tamaño y peso de las larvas de *Zophobas*, 0,4648 g ( $\pm 0,0324$  g) y 3,64 cm ( $\pm 0,079$  cm) de longitud frente a 0,0454 g ( $\pm 0,0024$  g) y 1,70 cm ( $\pm 0,062$  cm) en *Tenebrio*. De esta manera, si tenemos en cuenta la biomasa, el consumo por cada gramo de larva de *T. molitor* es 1,7 veces mayor que las de *Z. atratus*.

Las larvas de *Tribolium castaneum*, también de la familia tenebrionidae, se han observado alimentándose de poliestireno extruido (XPS). La investigación del microbioma de su intestino mostró que *Acinetobacter sp.* estaba altamente asociado a la digestión de PS y se consiguió aislar la especie *Acinetobacter sp. AnTc-1* capaz de degradar PS (Wang et al., 2020).

Alejándonos de los coleópteros, las larvas de la polilla *Galleria mellonella* conocidas como gusanos de la cera, son capaces de degradar PE y de PS. Tras 21 días con PE y PS en diferentes grupos como únicas fuentes de carbono, el consumo de PE por larva fue de 1,95 g, y el consumo de PS por larva fue de 0,88 g. A pesar de su capacidad de consumo, estas fuentes no les proporcionan todos los nutrientes necesarios y el ratio de supervivencia fue de un 35,3% y de un 23,6% respectivamente. Al añadir a la dieta de PE, cera de abeja, el consumo se redujo a 1,27 g pero el ratio de supervivencia aumentó a un 77,3% y al añadirla a la dieta de PS el consumo se redujo a 0,64 g pero la supervivencia fue de un 66% (Lou et al., 2020). A partir del intestino de las larvas, se aisló *Enterobacter sp.* cepa D1, capaz de degradar PE (Ren et al., 2019).

*Bacillus sp.* cepa YP1, *Enterobacter asburiae* cepa YT1 fueron aisladas del aparato digestivo de las larvas de la polilla *Plodia interpunctella*, las cuales, habían sido observadas ingiriendo embalajes de PE (Yang et al., 2014). En el estudio realizado por Yang et al. (2014), se observó un aumento en la cantidad de grupos carbonilo, aparición de biofilms y cambios en las propiedades físicas y químicas de los fragmentos inoculados con las cepas YT1 e YP1 tras 28 días de incubación, indicando que las cepas aisladas tenían la capacidad de degradar estructuras de PE.

## 8- MODIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA DE ORGANISMOS SUPERIORES (PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)

Todos los datos anteriores nos indican que hay una cantidad mayor de la que se podría esperar de organismos que pueden degradar polímeros gracias a la acción de las bacterias que se encuentran en su intestino. En este proyecto se propone diseñar un experimento que permita estudiar la transferencia de una microbiota de un organismo a otro, observar si las bacterias son capaces de colonizar el nuevo intestino además de comparar la microbiota entre los organismos donantes y receptores y estudiar si el organismo portador adquiere la capacidad secundaria de degradar plásticos.

Las larvas de *Tenebrio molitor* serán el donante de la microbiota, pues hasta la fecha han sido los organismos más estudiados en cuanto a biodegradación de PS y PE se refiere. Se propone como receptor las larvas de otro coleóptero de la familia Tenebrionidae que no sea capaz de degradar PS y PE, por ejemplo *Gnathocerus cornutus*.

Este proyecto tiene dos fases:

En la primera se realizará una selección artificial de la microbiota de *T. molitor* óptima para la degradación de PS y PE, se realizará la transferencia de esta misma microbiota a individuos de la misma especie tratados previamente con gentamicina para eliminar su microbiota y se observará si los individuos inoculados recuperan la capacidad de degradación (Figura 2). En la segunda fase se transferirá este inóculo a individuos de *G. cornutus* tratados con gentamicina, se examinará si la colonización del intestino es correcta y si esta especie consigue lograr la degradación del polímero PS y del polímero PE (Figura 3).

#### - FASE 1 Selección de microbiota y transferencia intraespecífica:

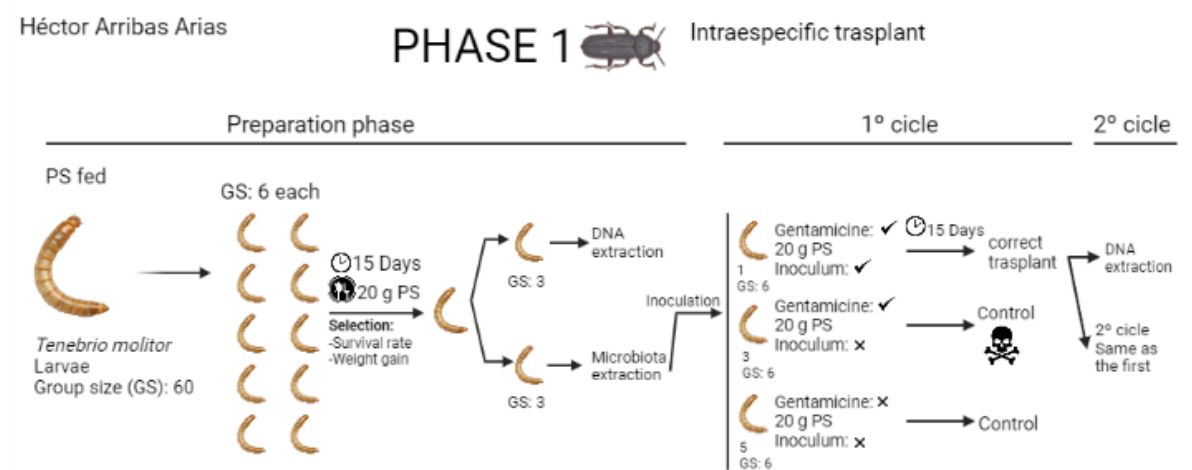


Figura 2: Esquema que ilustra la primera fase del diseño con PS.

#### Preparación para la selección

Hacemos dos grupos de 60 larvas cada uno, en el primero, las larvas de *T. molitor* se mantienen en una dieta con PS (Espuma de poliestireno) durante 15 días en 10 subgrupos de 6 larvas cada uno y 20 g de PS, en el segundo grupo mantenemos a las larvas de *T. molitor* en una dieta de PE (Espuma de polietileno) durante 15 días en 10 subgrupos de 6 larvas cada uno y 20 g de PE. Haciendo esto, las



cepas de microorganismos degradadoras de PS y PE presentes en su tracto intestinal aumentarán en número relativo. Se espera un enriquecimiento de los OTUs *Citrobacter sp.* y *Kosakonia sp.* como ya fue demostrado por Brandon et al. (2018). Ambos grupos de la familia enterobacteriaceae, los cuales están altamente asociados a las dietas de PS y PE como única fuente de carbono.

### Extracción de la microbiota seleccionada y extracción de DNA

Dentro del grupo 1 y 2 de la fase preparatoria se elegirá a un conjunto de larvas según dos criterios, aumento del peso corporal y supervivencia, se seleccionarán aquellas que hayan sobrevivido con el mayor consumo de plástico posible. A partir de las larvas de cada grupo se hacen dos suspensiones del contenido intestinal, la primera suspensión se va a transferir a un tubo de ensayo que contenga un medio LCFBM (Liquid Carbon Free Basal Medium) (Yang et al., 2014), libre de posibles fuentes de carbono alternativas.-A partir de estos extractos realizaremos dos inóculos que serán transferidos a los grupos 1 y 2 del 1º ciclo de transferencia de microbiota, el 1 recibirá el inóculo procedente de la extracción de los grupos alimentados con PS, y el 2, el de los grupos alimentados con PE. Haremos otra extracción de los dos grupos de la fase preparatoria, esta vez para adquirir el DNA y así conocer el estado de la microbiota, reproduciendo los pasos realizados por Brandon et al. (2018) y Lou et al. (2020). Se extraerá el intestino de estas larvas, y se hará un lavado cuádruple por centrifugación con 100µl de un buffer de extracción de DNA (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, & 1% CTAB). Las paredes del intestino son desechadas, y el DNA de la microbiota se puede extraer utilizando el kit MioBio powerlyzer Powersoil con una modificación de 25:24:1 (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico) para conseguir un mejor rendimiento. Se podría utilizar “Phasing amplicon sequencing (PAS)” para secuenciar la región V4 del RNAr 16s. La librería del gen rRNA 16s se realizaría con el kit Miseq reagent version 3 (Illumina, San Diego, CA), y la secuenciación podría realizarse utilizando una plataforma illumina Miseq (Wu et al., 2015).

### Inoculación en el hospedador intraespecífico

Para las larvas que van a recibir el inóculo de la microbiota seleccionada en el paso anterior, haremos 6 grupos de 6 larvas de *T. molitor*.

Grupo	1	2	3	4	5	6
Inóculo	✓	✓	✗	✗	✗	✗
Antibiótico	✓	✓	✓	✓	✗	✗

Los grupos 1,3,5 serán alimentados con 20 g de PS y los grupos 2,4,6 con 20 g de PE durante 15 días, la adición del antibiótico degradará la microbiota impidiendo la capacidad de digestión de los plásticos.

Adición del inóculo: La falta de bibliografía obliga a dejar este paso sin detallar, sin embargo, podemos descartar la inyección en el abdomen por la altísima probabilidad de septicemia, e indicar



que lo más recomendable sería utilizar algún probiótico. Se hará una puesta a punto de las mejores condiciones para aplicar el inóculo cuando proceda.

### **Observación de resultados**

Los grupos 5 y 6 al no haber sido tratados con antibiótico ni con inóculo deberían de poder consumir tanto el PS como el PE. Los grupos 3 y 4 morirán o su número se verá altamente reducido, pues al ser tratados con gentamicina pero no recibir inóculo de microbiota no podrán degradar los polímeros. Los grupos 1 y 2 indicarán si las larvas de *T. molitor* pueden o no recuperar la capacidad de degradación de PS y PE tras ser tratadas con el antibiótico. Esto serviría como una confirmación más para indicar la importancia que tienen las bacterias en la microbiota de este organismo y nos permitiría realizar la segunda fase del experimento, la transferencia interespecífica de microbiota. También si el resultado es que sí son capaces de recuperar esta capacidad, habría que observar si la cantidad de plástico consumido es menor, mayor o igual a la del grupo de *Tenebrio* inicial.

Se realizará una extracción de DNA de la microbiota de la mitad de los miembros de los grupos 1 y 2, de la misma manera que se hizo la extracción de los individuos de la fase de preparación. Esto nos permitirá efectuar una comparación a través de dos factores, diversidad, es decir, el número de especies que hay en el medio intestinal y abundancia, que nos indicará cuál es el porcentaje que ocupan cada una de esas familias de bacterias.

### **Colonización del hospedador intraespecífico (2º ciclo) (Ampliable a n ciclos)**

Si los grupos 1 y 2 dan positivo en supervivencia y aumento de tamaño, es decir, si el trasplante y la colonización son exitosos, se llevará a cabo un segundo ciclo que nos permitirá hacer una selección más exhaustiva de los grupos bacterianos más importantes en el consumo de estos materiales. Para ello se hará una extracción de la microbiota de la mitad de los individuos de los grupos 1 y 2 y la introduciremos en un medio LCFBM de la misma manera que hicimos en el primer ciclo. De estos medios cogeremos muestras y realizaremos un inóculo en la siguiente tanda de grupos siguiendo el mismo patrón que en el primer proceso de colonización (Figura 3). Este ciclo puede ser extendido múltiples veces utilizando el mismo patrón según se considere necesario.

### **Observación de resultados (2º ciclo/ n ciclo)**

Se espera que los grupos 5' y 6' consuman aproximadamente la misma cantidad de PS y PE, los grupos 3' y 4' si el antibiótico ha funcionado no deberían de sobrevivir, y los grupos 1' y 2' deberían consumir la misma cantidad que el grupo anterior o mayor si se consigue un enriquecimiento con los microorganismos que poseen mayor capacidad degradativa. Hacemos una extracción del intestino de estos últimos dos grupos, extracción de DNA igual que las anteriores veces. Así, podremos realizar una comparación de la diversidad de los grupos antes del trasplante (Preparación), y los grupos de los ciclos 1º y 2º.

- FASE 2 Transferencia interespecífica

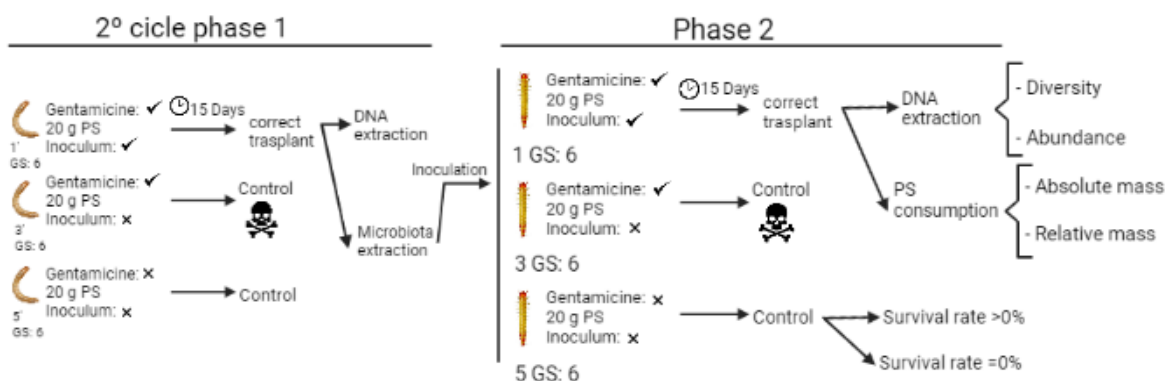


Figura 3: Esquema que ilustra la segunda fase del diseño con PS

### Inoculación en el hospedador interespecífico

Con la finalidad de estudiar si es posible la transferencia de una microbiota funcional en la degradación de plástico de un organismo a otro utilizaremos larvas de *G. cornutus* siguiendo un patrón en 6 grupos iguales que en la fase 1. A partir de la extracción de la microbiota de *T. molitor* de los grupos 1' y 2' del segundo ciclo o n ciclo de la 1ª fase, haremos un inóculo que introduciremos en las larvas de *G. cornutus*. Se alimentará a las larvas durante 15 días y se examinarán los resultados.

### Observación de resultados

La interpretación de los resultados se haría de forma similar a la de la fase 1. En los grupos 5 y 6 sin haber sido tratados con gentamicina no deberían de poder consumir PS ni PE, estos grupos, al no poder consumir el sustrato deberían morir. Cabe la posibilidad de que sin embargo sí pudiesen no solo masticar, sino también digerir PS o PE. Esta información es relevante, pero no afectaría de forma directa al experimento gracias al tratamiento con gentamicina que eliminaría la microbiota.

En los grupos 3 y 4 habiendo sido tratados con gentamicina no deberían de poder consumir el PS y el PE, por lo que si el antibiótico funciona, deberían morir. En los grupos 1 y 2 habiendo sido tratados con gentamicina y suministrados con el inóculo habría que observar si las bacterias han colonizado de manera correcta el organismo y si son capaces de consumir o no PS, PE o ambos, y en qué medida.

A partir de los grupos 1 y 2 de *Gnathocerus* si han sobrevivido, es decir, si consiguen comenzar a degradar el sustrato presentado, masticándolo y digiriéndolo (Supervivencia > 0%, ganancia de masa corporal positiva) se hará una suspensión del tracto intestinal para la realización de una extracción de DNA de la misma manera que hicimos las extracciones en la fase 1. Esto nos permitiría comparar la diversidad y abundancia bacteriana frente a las microbiota de las larvas de *Tenebrio* en los diferentes ciclos de la fase 1, observar si existe una mayor correlación entre la microbiota intestinal de los grupos 1' y 2' de *T. molitor* y la microbiota intestinal de los grupos 1 y 2 de *G. cornutus* o si la selección que se hizo en la fase 1 es irrelevante en la colonización del hospedador interespecífico. Además, se podría

observar si existe algún tipo de efecto sinérgico entre el ambiente del intestino de las larvas de *G. cornutus* y las bacterias que componen su microbiota, de la misma manera que existe un efecto sinérgico entre el ambiente intestinal de *T. molitor* y su microbiota intestinal, en cuanto a velocidad y volumen de degradación se refiere.

### **Posibles fallos**

La elección de *G. cornutus* como receptor de la microbiota se basa en la proximidad filogenética con *T. molitor* así como en la similitud de sus modos de vida y hábitats. Sin embargo, esta elección se ve dañada por la falta de publicaciones sobre esta especie, y el desconocimiento de la posibilidad que estos coleópteros tengan una microbiota con la capacidad de degradar algún tipo de polímero. Este problema se ve solventado con el método utilizado antes del trasplante, el uso del antibiótico gentamicina para inhibir a este tipo de bacterias, no obstante, es importante su indicación.

### **Conclusiones del diseño experimental y posibles líneas futuras**

Tras el diseño del experimento se hace clara la falta de bibliografía en este ámbito. Sin embargo, ha habido en los últimos 3 años un aumento considerable de los artículos relacionados con la microbiota de insectos y el uso de insectos como posibles recipientes para una degradación más controlada y eficaz de diferentes tipos de polímeros mostrando prometedores resultados. A fecha de entrega, no existe ningún artículo publicado o revisado que pruebe de manera práctica la transferencia interespecífica de microbiota para la adquisición de la capacidad de degradar polímeros plásticos, por lo que podría ser interesante estudiar esta línea de investigación. Si los resultados fuesen positivos podría pensarse en escalar la distancia filogenética del trasplante.

## **9- CONCLUSIONES**

El número de artículos sobre esta materia está creciendo exponencialmente, indicándonos un aumento de la preocupación e interés por el problema. La plastisfera es un ecosistema altamente diverso con variaciones a lo largo del tiempo y en el que los microorganismos fabricantes de biofilms que no necesariamente degradan polímeros son extremadamente importantes para el mantenimiento del mismo. Los factores que afectan a la biodegradación de los polímeros que conforman la plastisfera van a ser tanto intrínsecos, de la estructura física y química del polímero, como extrínsecos, la solubilización, la hidrólisis espontánea, la oxidación y la escisión enzimática. Centrándonos en los plásticos, PET, PS y PE, que conforman la mayor parte de la plastisfera, podemos encontrar múltiples microorganismos que degraden parcialmente los polímeros, sin embargo, se hace evidente la importancia de los consorcios bacterianos si se desea una mineralización (degradación completa).

En cuanto a bacterias simbiotas de la microbiota de diferentes organismos, podemos encontrar múltiples insectos cuya microbiota intestinal actúa de manera sinérgica con el hospedador y es

indispensable para la ruptura diferentes enlaces que se encuentran en varios polímeros sintéticos, permitiéndoles digerir gran parte del plástico que consumen. Varias larvas de coleópteros de la familia Tenebrionidae, y dos larvas de polillas, *Galleria mellonella* y *Plodia interpunctella* se han descubierto con esta capacidad degradativa. Por último, se ha propuesto un diseño experimental cuyo objetivo es indicar si es posible realizar un trasplante intraespecífico e interespecífico de la microbiota intestinal y examinar la recuperación o adquisición de la capacidad de degradar algunos tipos de plásticos además de realizar una comparación entre la microbiota de los organismos en los diferentes ciclos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, H. (2003). Relationship between  $\beta$ -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), 35-42. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(02\)00120-8](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(02)00120-8)
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R. & Mincer, T. J. (2020, Marzo). Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews / Microbiology*, 18, 139-151. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0308-0>
- Andrady, A. L. & Gregory, M. R. (2003). *Plastics and the Environment*, 381-382. John Wiley and Sons.
- Brandon, A., Gao, S., Tian, R., Ning, D., Yang, S., & Zhou, J. et al. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6526-6533. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301>
- Chauhan, D., Agrawal, G., Deshmukh, S., Roy, S., & Priyadarshini, R. (2018). Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation. *RSC Advances*, 8(66), 37590-37599. <https://doi.org/10.1039/c8ra06448b>
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. (2019). Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Applied And Environmental Microbiology*, 85(19). <https://doi.org/10.1128/aem.01095-19>
- De Tender, C., Devriese, L., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., & Cattrijsse, A. et al. (2017). Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7350-7360. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00697>
- Debroas, D., Mone, A., & Ter Halle, A. (2017). Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Science Of The Total Environment*, 599-600, 1222-1232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.059>
- Delacuvelleriea, A., Cyriaque, V., Gobert, S., Benali, S., Wattiez, R. (2019). The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low density polyethylene degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 380, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120899>
- Dimarogona, M., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., & Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(11), 2308-2317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.009>
- Fu, B., Xu, T., Cui, Z., Ng, H., Wang, K., Li, J., & Li, Q. (2018). Mutation of Phenylalanine-223 to Leucine Enhances Transformation of Benzo[a]pyrene by Ring-Hydroxylating Dioxygenase of *Sphingobium* sp. FB3 by increasing

- Accessibility of the Catalytic Site. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 66(5), 1206-1213. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05018>
- Fujishiro, T., Shoji, O., Kawakami, N., Watanabe, T., Sugimoto, H., Shiro, Y., & Watanabe, Y. (2012). Chiral-Substrate-Assisted Stereoselective Epoxidation Catalyzed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Cytochrome P450SPa. *Chemistry - An Asian Journal*, 7(10), 2286-2293. <https://doi.org/10.1002/asia.201200250>
  - Gyung Yoon, M., Jeong Jeon, H., & Nam Kim, M. (2012). Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *Journal Of Bioremediation & Biodegradation*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000145>
  - Hadad, D., Geresh, S., & Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal Of Applied Microbiology*, 98(5), 1093-1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x>
  - Hou, L., & Majumder, E. (2021). Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms. *Materials*, 14(3), 503. <https://doi.org/10.3390/ma14030503>
  - Hu, K., Tian, W., Yang, Y., Nie, G., Zhou, P., & Wang, Y. et al. (2021). Microplastics remediation in aqueous systems: Strategies and technologies. *Water Research*, 198, 117144. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117144>
  - Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M., & Kawai, F. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 87(2), 771-779. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2555-x>
  - Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T., Perryman, M., & Andrady, A. et al. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
  - Kim, H., Lee, H., Yu, H., Jeon, E., Lee, S., Li, J., & Kim, D. (2020). Biodegradation of Polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (Larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental Science & Technology*, 54(11), 6987-6996. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01495>
  - Kirstein, I. V., Wichels, A., Gullans, E., Krohne, G., Gerds, G. (2019). The Plastisphere – Uncovering tightly attached plastic “specific” microorganisms. *PLoS ONE*, 14(4), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215859>
  - Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S., Lu, B., Liu, B., & Ren, N. et al. (2020). Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella*) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 54(5), 2821-2831. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07044>
  - Maurya, A., Bhattacharya, A., & Khare, S. (2020). Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602325>
  - Minerdi, D., Sadeghi, S., Di Nardo, G., Rua, F., Castrignanò, S., Allegra, P., & Gilardi, G. (2014). CYP116B5: a new class VII catalytically self-sufficient cytochrome P450 from *Acinetobacter radioresistens* that enables growth on alkanes. *Molecular Microbiology*, 95(3), 539-554. <https://doi.org/10.1111/mmi.12883>
  - Montazer, Z., Habibi Najafi, M., & Levin, D. (2020). Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene. *Polymers*, 12(1), 123. <https://doi.org/10.3390/polym12010123>
  - Mukherjee, S., RoyChaudhuri, U., & Kundu, P. (2017). Biodegradation of polyethylene via complete solubilization by the action of *Pseudomonas fluorescens*, biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* and anionic surfactant. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(5), 1300-1311. <https://doi.org/10.1002/jctb.5489>

- Peng, B., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., & Criddle, C. et al. (2020). Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International*, 145, 106106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106106>
- Peng, B., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., & Benbow, M. et al. (2019). Biodegradation of Polystyrene by Dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio molitor*) Mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science & Technology*, 53(9), 5256-5265. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06963>
- Peng, T., Luo, A., Kan, J., Liang, L., Huang, T., & Hu, Z. (2018). Identification of A Ring-Hydroxylating Dioxygenases Capable of Anthracene and Benz[a]anthracene Oxidization from *Rhodococcus* sp. P14. *Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology*, 28(4), 183-189. <https://doi.org/10.1159/000494384>
- Pérez-García, P., Danso, D., Zhang, H., Chow, J., & Streit, W. (2021). Exploring the global metagenome for plastic-degrading enzymes. *Methods In Enzymology*, 137-157. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.022>
- Przemieniecki, S., Kosewska, A., Ciesielski, S., & Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 256, 113265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113265>
- *Publicaciones :: PlasticsEurope*. Plasticseurope.org. (2021). Retrieved 20 August 2021, from <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/4803-plasticos-situacion-en-2020>.
- Raiger Iustman, L. J., López, N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, 8 (3), 146-161.
- Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., & Wang, B. et al. (2019). Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 16(11), 1941. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111941>
- Restrepo-Flórez, J., Bassi, A., & Thompson, M. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Rojo, F. (2010). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. *Handbook Of Hydrocarbon And Lipid Microbiology*, 781-797. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_59](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_59)
- Salager, J. (1993). *Surfactantes en solución acuosa* (2nd ed., p. 16). Laboratorio FIRP Escuela de INGENIERIA QUIMICA, UNIVERSIDAD de Los ANDES.
- Santo, M., Weitsman, R., & Sivan, A. (2013). The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.001>
- Shah, A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shoji, O., Fujishiro, T., Nakajima, H., Kim, M., Nagano, S., Shiro, Y., & Watanabe, Y. (2007). Inside Cover: Hydrogen Peroxide Dependent Monooxygenations by Tricking the Substrate Recognition of Cytochrome P450BS $\beta$  (Angew. Chem. Int. Ed. 20/2007). *Angewandte Chemie International Edition*, 46(20), 3592-3592. <https://doi.org/10.1002/anie.200790087>
- Suresh, B., Maruthamuthu, S., Khare, A., Palanisamy, N., Muralidharan, V., & Ragunathan, R. et al. (2011). Influence of thermal oxidation on surface and thermo-mechanical properties of polyethylene. *Journal Of Polymer Research*, 18(6), 2175-2184. <https://doi.org/10.1007/s10965-011-9628-0>



- Takahashi, S., Mukai, H., Tanabe, S., Sakayama, K., Miyazaki, T., & Masuno, H. (1999). Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environmental Pollution*, 106(2), 213-218. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00068-8](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00068-8)
- Takei, D., Washio, K., & Morikawa, M. (2008). Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1447-1452. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9710-9>
- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades polyethylene terephthalate. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813-2818. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058>
- Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *ACS Catalysis*, 9(5), 4089-4105. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171>
- Vague, M., Chan, G., Roberts, C., Swartz, N., & Mellies, J. (2019). Pseudomonas isolates degrade and form biofilms on polyethylene terephthalate (PET) plastic. <https://doi.org/10.1101/647321>
- Vimala, P., & Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus Subtilis*. *Procedia Technology*, 24, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.031>
- Wallace, N., Adams, M., Chafin, A., Jones, D., Tsui, C., & Gruber, T. (2020). The highly crystalline PET found in plastic water bottles does not support the growth of the PETase -producing bacterium *Ideonella sakaiensis*. *Environmental Microbiology Reports*, 12(5), 578-582. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12878>
- Wang, Z., Xin, X., Shi, X., & Zhang, Y. (2020). A polystyrene-degrading Acinetobacter bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. *Science Of The Total Environment*, 726, 138564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138564>
- Wu, L., Wen, C., Qin, Y., Yin, H., Tu, Q., & Van Nostrand, J. et al. (2015). Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0450-4>
- Xu, J., Cui, Z., Nie, K., Cao, H., Jiang, M., & Xu, H. et al. (2019). A Quantum Mechanism Study of the C-C Bond Cleavage to Predict the Bio-Catalytic Polyethylene Degradation. *Frontiers In Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00489>
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environmental Science & Technology*, 48(23), 13776-13784. <https://doi.org/10.1021/es504038a>
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W., Zhao, J., Song, Y., & Gao, L. et al. (2015). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12087-12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663>
- Yin, C., Xu, Y., & Zhou, N. (2020). Biodegradation of polyethylene mulching films by a co-culture of *Acinetobacter* sp. strain NyZ450 and *Bacillus* sp. strain NyZ451 isolated from *Tenebrio molitor* larvae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155, 105089. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105089>
- Zettler, E. R., Mincer, T. J. & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>